

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université des Frères Mentouri Constantine 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

N° d'ordre.....

N° de série.....

## **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie  
Option Nutrition Moléculaire et Santé

# **Exploration du protéome salivaire des sujets obèses par application de la technique d'électrophorèse**

**Présenté par :**

- Maazouzi Ahlem
- Boukedjouta Malika

**Devant le jury :**

- Président : Prof. KHELIFI Douadi, UFMC
- Examineur : Prof. NOUADRI Tahar, UFMC
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC

**Année universitaire 2016/2017**

# *Remerciements*

*En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les Difficultés.*

*Ce mémoire n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de notre encadreuse, Madame BELLIL Inès, qui a non seulement été pour nous un professeur mais aussi une directrice de Master, toujours disponible et efficace. Nous la remercions pour toute la confiance et la liberté qu'elle nous a accordées au cours de ces mois de travail.*

*Un très grand merci à Mr : le professeur KHELIFI. D, de nous avoir accepté au sein de son laboratoire pour réaliser ce travail.*

*Monsieur, le professeur : NOUADRI. T, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre connaissance et de nos profonds respects.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté de consacrer de leur temps pour juger ce travail.*

*Enfin, nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à nos questions durant les années des études.*

## *Dédicaces*

*A mes chers parents : Kamel et Nassira*

*Sources de mes joies, secrets de ma force, vous serez toujours le modèle,*

*Papa dans ta détermination, ta force et ton honnêteté,*

*Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour nous.*

*Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent,*

*Merci d'être tout simplement mes parents. C'est à vous que je dois cette réussite  
et je suis fière de vous l'offrir.*

*A mon frère, le bijou de la famille : Abd el krim*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A mon mari Sofiane, la personne qui a su guider mes pas égarés vers un  
horizon plus clair, plus joyeux, qu'Allah te protège pour moi !*

*A mes tantes et a mes oncles, mes cousins et cousines*

*Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.*

*A tous les membres des familles BOUKEDJOUTA, petits et*

*grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.*

*A mes chères amies, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour  
vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des  
sœurs et des amies sur qui je peux compter.*

**MALIKA**

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail tous d'abord :  
À mes très chers parents qui m'ont soutenu et encouragé durant toute  
la période de mes études et à qui je souhaite une longue et heureuse  
vie « un grand merci pour tout ».*

*À mes chers sœurs : zahra, soumia, yassmin, rana  
À mon frère : islem*

*À ma chère amie et ma sœur : imen.  
Avec très grande joie à mon cher mari djemel à qui je souhaite la  
bonne  
santé et plus de réussites ensemble.*

*À tous mes enseignants depuis le primaire Jusqu'à l'université.  
En fin, à tout ceux qui m'aime.*

*AHLEM*

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>FPM</b> :	Faible poids moléculaire
<b>HPM</b> :	Haut poids moléculaire
<b>IAS</b> :	Indice Absolue de Similarité
<b>IMC</b> :	Indice de Masse Corporelle.
<b>IRS</b> :	Indice relatif de similarité
<b>LEPR</b> :	Récepteur de la leptine
<b>MC4R</b> :	Récepteur de type 4 aux mélanocortines
<b>OMS</b> :	Organisation Mondiale de la santé
<b>PAGE</b> :	polyacrylamid Gel Electrophoresis
<b>POMC</b> :	Proopiomélanocortine
<b>SDS</b> :	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SIM1</b> :	single-minded homolog 1
<b>TCA</b> :	Trichloracétique Acide
<b>TEMED</b> :	Tétra méthyl-Ethylène-diamine

# Résumé

---

## Résumé

L'obésité est devenue un problème majeur de santé publique avec une prévalence qui dépasse les 30 % dans certaines sociétés occidentales. L'obésité est un reflet du développement excessif du tissu adipeux lié à un stockage massif de lipides sous forme de triglycérides (hypertrophie et hyperplasie adipocytaires) et due à un déséquilibre de la balance énergétique. Les déterminants de l'obésité sont multiples et leur interaction est complexe. Au-delà de facteurs biologiques ou génétiques individuels que l'on ne peut négliger, il s'agit d'une maladie à part entière qui altère la qualité de vie et entraîne des complications somatiques, psychologiques et sociales.

L'utilisation des biomarqueurs protéiques apparaît prometteuse comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique.

L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome salivaire des patients obèses par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle pour la recherche des biomarqueurs salivaires de l'obésité.

Pour cela 20 patients obèses ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus des protéines salivaires du sujet sain et des patients obèses. Les protéines salivaires sont extraites dans la condition dénaturante réductrice.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 31 bandes protéiques de mobilités différentes. Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, et en établissant des diagrammes types.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines salivaires spécifiques et/ou variantes susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de l'obésité.

**Mots clés :** obésité, salive, biomarqueurs, électrophorèse, similarité, diagnostic.

# Résumé

---

## Summary

Obesity has become a major public health problem with prevalence in excess of 30% in some Western societies. Obesity is a reflection of the excessive development of adipose tissue associated with massive lipid storage in the form of triglycerides (hypertrophy and adipocyte hyperplasia) and due to an imbalance in the energy balance.

The determinants of obesity are multiple and their interaction is complex. Beyond individual biological or genetic factors that can not be overlooked, it is a disease in its own right that alters the quality of life and causes somatic, psychological and social complications.

The use of protein biomarkers appears promising as a biological tool to distinguish a normal medical condition from a pathological condition.

The objective of this study is to investigate and explore the salivary proteome of obese patients by using the one-dimensional electrophoresis technique for the research of salivary biomarkers of obesity.

For this purpose, 20 obese patients were recruited for salivary sampling. We compared the electrophoretic profiles obtained from healthy subjects' salivary proteins and obese patients. The salivary proteins are extracted in the reducing denaturing condition.

The analysis of the gels allowed to count 31 protein bands of different mobilities. In order to numerically assess the diversity of these salivary proteins, a statistical study was carried out by calculating the frequencies, the similarity index, and by establishing standard diagrams.

These preliminary results have shown specific salivary proteins and / or variants can be considered as markers of obesity.

**Key words:** obesity, saliva, biomarkers, electrophoresis, similarity, diagnosis.

### الملخص:

أصبحت السمنة مشكله رئيسيه في الصحة العامة ،مع انتشار تجاوز 30% في بعض المجتمعات الغربية السمنة انعكاس لتطور مفرط للأنسجة الدهنية بسبب التراكم الكبير للدهون الثلاثية تؤدي الى اختلال في توازن الطاقة في الجسم (تضخم الخلايا الشحمية). محددات السمنة كثيرة وتدخلاتها معقدة منها العوامل البيولوجية والوراثية ، السمنة مرض يؤثر على نوعية الحياة ويسبب تعقيدات جسدية اجتماعية ونفسية. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة واستكشاف البروتينوم اللعابي عند المرضى الذين يعانون من السمنة عن طريق استخدام تقنية الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد للكشف عن المؤشرات الحيوية اللعابية للسمنة .

لهذا الغرض تم اخذ 20 شخص يعانون من السمنة ،تم اخذ عينات اللعاب منهم ،قارنا نتائج الهجرة الكهربائية للبروتينات اللعابية بين الاشخاص المصابين مع الحالة العادية. يتم استخراج البروتينات في الشرط مرجع ومغير للحالة الطبيعية.

فصل المواد الهلامية يسمح بحساب 31 شريط بروتيني بمسافات هجرة كهربائية مختلفة .

لكي نحدد تنوع البروتينات اللعابية تم اجراء دراسة إحصائية وذلك بحساب الترددات، مؤشر التشابه انشاء المخططات النموذجية.

واظهرت النتائج الأولية بروتينات محددة ومتغيرة يمكن اعتبارها مؤشرات للسمنة.

**الكلمات المفتاحية :** السمنة ،المؤشرات الحيوية، الهجرة الكهربائية، التشابه، التشخيص.



# Sommaire

---

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

1. L'obésité .....	3
1.1 Définition .....	3
1.2 Type d'obésité .....	3
1.3 Diagnostic et examen de l'obésité.....	4
1.3.1. L'indice de masse corporelle.....	4
1.3.2. Périmètre abdominal .....	5
1.3.3. Adipomètre.....	5
1.3.4. Rapport tour de taille / tour de hanche .....	5
1.4. Les causes de l'obésité .....	6
1.4.1. Le facteur héréditaire et les déséquilibres hormonaux .....	6
1.4.2. Les facteurs environnementaux .....	7
1.4.3. Les facteurs psychologiques.....	7
1.5. Physiopathologie de l'obésité.....	8
2. La salive .....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Composition de la salive .....	9
2.2.1. L'eau.....	9
2.2.2. Constituants inorganiques .....	9
2.2.3. Constituants organiques.....	10
2.2.3.1. Protéines extrinsèques .....	10
2.2.3.2. Protéines intrinsèques.....	10
3. Lien obésité – salive – biomarqueur.....	11
3.1. Notion de biomarqueur.....	11
3.2. La piste de la salive dans la génétique de l'obésité .....	12

# Sommaire

---

## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Matériels .....	13
1.1. Recrutement des patients .....	13
1.2. Recueil de la salive .....	14
2. Méthodes .....	14
2.1. Extraction des protéines salivaires .....	14
2.2. Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE .....	14
2.3. Lecture des électrophorégrammes .....	16
2.4. Analyse statistiques .....	16

## Chapitre 3 : Résultats et Discussions

1. Fractionnement des protéines et recherche des biomarqueurs .....	17
1.1. Analyse des profils électrophorétiques .....	17
2. Etude de la variabilité des protéines salivaires .....	19
2.1. Etude des protéines salivaires de HPM .....	19
2.2. Etude des protéines salivaires de FPM .....	20
3. Etablissement des diagrammes types .....	21
4. Indice de similarité des diagrammes protéiques .....	23
<b>Conclusion</b> .....	25
<b>Références bibliographiques</b> .....	26

## Annexes

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1 : Valeurs de l'indice de masse corporelle (IMC) pour définir les catégories de poids des adultes.....</b>	<b>05</b>
<b>Tableau 2 : Rapport tour de taille/tour de hanche.....</b>	<b>05</b>
<b>Tableau 3 : Risque relatif d'obésité à l'âge adulte (D'après Picoche-Gothié 2005).....</b>	<b>07</b>
<b>Tableau 4 : Constituants ioniques de la salive.....</b>	<b>10</b>
<b>Tableau 5: Liste des 23 échantillons analysés.....</b>	<b>13</b>
<b>Tableau 6 : Variabilité des protéines salivaires de HPM.....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de FPM.....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 8: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices.....</b>	<b>22</b>
<b>Tableau 9: matrice des indices de similarité entre les échantillons.....</b>	<b>23</b>

## Liste des figures

---

**Figure 1 : types d'obésité.....03**

**Figure 2 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. 12 13 16 : témoins. 1 à10 patients.....18**

**Figure 3: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. 12 13 16 : témoins. 11 à 21 patients.....18**

# INTRODUCTION

## Introduction générale

---

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2008), le surpoids et l'obésité représentent le 5<sup>ème</sup> facteur de risque de décès au niveau mondial. Chaque année 2,8 millions d'adultes décèdent des suites de ces affections : 44% de la charge du diabète, 23% de la charge des cardiopathies ischémiques et 7 à 41% de la charge de certains cancers sont attribués au surpoids et à l'obésité.

L'obésité est un problème de santé publique en Algérie. Selon l'étude TAHINA (2010) réalisée en Algérie, la prévalence de l'obésité totale et abdominale en est, respectivement, de 9.1% et 15.3% chez les hommes, et 30.1% et 52.0% chez les femmes. ***Le projet TAHINA (2010) lance un cri d'alarme et recommande des stratégies d'intervention sanitaire en Algérie.*** Un rapport de l'organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) datant de 2013 indique que 15,9% des enfants et 17,5% d'adultes sont concernés en Algérie. Plus de 6 millions d'Algériens sont en surcharge pondérale. A titre de comparaison, le même rapport indique que l'obésité touche 9% d'enfants et 23,8% d'adultes en Tunisie. Pour le Maroc, les chiffres sont de 14,9% pour les enfants et 17,3% pour les adultes.

Récemment, la piste de la salive dans la génétique de l'obésité vient d'être découverte par une équipe internationale coordonnée par le professeur Philippe Froguel du laboratoire Génomique et maladies métaboliques (CNRS /Université Lille 2/Institut Pasteur de Lille). En effet, les chercheurs montrent que les personnes qui ont le plus petit nombre de copies d'amylase salivaire (et ainsi peu d'enzyme amylase dans leur sang) ont un risque multiplié par 10 de devenir obèses.

Dans ce contexte, la salive peut être considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de marqueurs salivaires. Ces données devraient nous permettre une approche différente de la physiopathologie des maladies endocrines et métaboliques, en particulier pour l'obésité.

La composition en protéine de la salive est le centre d'intérêt de nombreuses investigations ces dernières années. Certaines protéines du sérum sont reconnus comme marqueurs potentiels de maladies et peuvent également être retrouvés dans la salive totale. Ces similitudes entre les protéines du sérum et les protéines salivaires ont encouragé les chercheurs à considérer la salive comme un fluide de diagnostic pour détecter des signes de pathologie.

## Introduction générale

---

Dans cette optique s'inscrit notre travail qui consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires de sujets sains et de patients obèses. Une telle démarche fait appel autant à des méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation des protéines qu'à des calculs statistiques analysant les relations existantes entre les différents patients.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous nous intéresserons à l'obésité, la salive et aux biomarqueurs. Le second chapitre sera centré sur l'étude effectuée en faisant un rappel sur le matériel biologique et les différentes méthodes utilisées. Et le dernier chapitre sera consacré aux résultats et leurs interprétations. Enfin, une conclusion, résumant l'essentiel de cette recherche, clôturera cette étude.



**Synthèse  
bibliographiques**



## 1. L'obésité

### 1.1. Définition

Le surpoids et l'obésité sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé [11]. Au niveau individuel, l'obésité résulte d'une balance énergétique positive, il s'agit d'un excès de calories ingérées par rapport à celles dépensées, stockées sous forme de graisse corporelle. Cette accumulation adipeuse liée à un comportement individuel dépend d'un système obésogène [9].

L'obésité doit être considérée comme une maladie et non plus comme un état. Elle a des conséquences négatives pour la santé physique, psychique et des conséquences sociales. selon [13]. l'obésité diminue l'espérance de vie.

L'obésité se développe en une première phase où le tissu adipeux stocke les calories, puis dans une seconde où le fonctionnement du tissu adipeux est perturbé [22].

### 1.2. Types d'obésité

Dans un contexte génétique, il est important de réaliser que l'obésité n'est pas un phénotype homogène et qu'il existe plusieurs formes d'obésité dont les conséquences sur la santé sont très différentes les unes des autres [1].

Dès 1956, ont divisé l'obésité en deux types (figure 1), selon la localisation de la graisse:

- L'obésité androïde (abdomino-mésentérique), caractérisée par une accumulation de graisse au niveau de l'abdomen, touche surtout les hommes.
- L'obésité gynoïde (fessio-crurale) caractérisée par une accumulation de graisse au niveau de la région glutéo-femorale, affecte plus particulièrement les femmes [9].

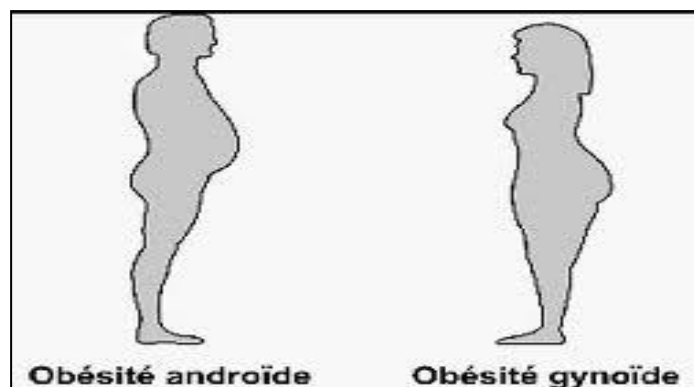


Figure 1 : types d'obésité [4].

# Synthèse bibliographique

---

Actuellement, quatre types d'obésité sont décrits:

- **le type I** : le surplus de graisse est réparti de manière généralisée, sans localisation préférentielle ;
- **le type II** : l'excès de graisse est concentré au niveau du tronc et de l'abdomen : on parle d'obésité androïde ; le dépôt est à la fois sous-cutané et viscéral.
- **le type III** : l'accumulation de graisse se fait dans l'abdomen : il est question d'obésité viscérale ;
- **le type IV** : la graisse se localise au niveau des hanches et des cuisses dans la région glutéo-fémorale, qui constitue un dépôt sous-cutané. C'est une obésité gynoïde[1].

Selon la distribution de la graisse on distingue :

- **Le tissu adipeux sous-cutané** : dépôt de graisse, formant une silhouette en forme de poire, localisé principalement au niveau des cuisses, des hanches et de l'abdomen. Cette forme de dépôt de graisse est souvent trouvée dans l'obésité gynoïde de la femme
- **Le tissu adipeux viscéral** : il entoure les organes internes et donne à la silhouette une forme de pomme (Cette accumulation de graisse est typique de l'obésité androïde des hommes. Toutefois, le modèle viscéral peut être présent chez les femmes, particulièrement après la ménopause [9].

## 1.3. Diagnostic et examen de l'obésité

### 1.3.1. L'indice de masse corporelle

L'obésité est définie à partir de l'*indice de masse corporelle (IMC)* qui est le rapport poids en kilogrammes divisé par la taille exprimée en mètres élevée au carré ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Un IMC supérieur à  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  permet de classer le patient comme obèse (tableau 1) [19].

L'IMC est corrélé à la quantité de masse adipeuse et c'est la mesure la plus utile pour évaluer le surpoids et l'obésité au niveau de la population car elle s'applique aux deux sexes et à toutes les tranches d'âge adulte [10]. L'IMC définit l'obésité de la même façon chez les hommes et chez les femmes, malgré une plus grande proportion de masse grasse chez les femmes dans chaque kilogramme de poids [22].

Lorsque l'obésité est dite "morbide" ou "cliniquement sévère" le risque de complications liées à l'obésité est beaucoup plus fréquent et le risque de mortalité augmente de façon très importante [1].

# Synthèse bibliographique

**Tableau 1 : Valeurs de l'indice de masse corporelle (IMC) pour définir les catégories de poids des adultes [19].**

<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Catégorie</i>	<i>Classe</i>
< 18,5	Maigreur	
18,5-24,9	Normalité	
25-29,9	Surpoids	
30-34,9	Obésité	Classe I (commune)
35-39,9	Obésité	Classe II (sévère)
> 40	Obésité	Classe III (massive ou morbide)

## 1.3.2. Périmètre abdominal

La mesure du tour de taille est un autre moyen d'apprécier l'obésité ou l'adiposité, en particulier l'adiposité abdominale. On mesure le sujet en position debout à mi-distance entre la base thoracique et la crête iliaque. L'obésité abdominale est évoquée lorsque le tour de taille dépasse 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme [1].

## 1.3.3. Adipometre

Cette mesure recherche le pourcentage de la masse adipeuse à partir de l'épaisseur du pli cutané. Selon les méthodes, la mesure est prise à deux ou trois sites différents et c'est la somme des plis cutanés qui déterminera la quantité de gras. En effet, on postule qu'environ 50% du total des lipides de l'organisme se trouve sous la peau [1].

## 1.3.4. Rapport tour de taille/tour de hanche

On peut mesurer aussi le tour de hanche. La mesure doit passer par la symphyse pubienne. Avec le tour de taille et le tour de hanche on peut définir l'obésité androïde et l'obésité gynoïde (tableau 2) [24].

**Tableau 2 : Rapport tour de taille/tour de hanche [24].**

	<b>Obésité androïde</b>	<b>Obésité gynoïde</b>
Hommes	TT/tour de hanche > 1	TT/tour de hanche < 1
Femmes	TT/tour de hanche > 0,85	TT/tour de hanche < 0,85

### 1.4. Les causes de l'obésité

En partant du postulat que la nature est bien faite, nous pouvons penser que les cas d'obésité apparaissant de manière « naturelle », c'est-à-dire indépendamment de la façon dont un individu se comporte face à la nourriture, sont rares. Cela se confirme à travers l'observation clinique.

La cause première de l'obésité reste, en effet, une inadéquation entre l'absorption d'énergie et les dépenses énergétiques. Mais nous ne sommes pas égaux face à une surconsommation alimentaire, et l'obésité résulte certainement d'une combinaison de facteurs [13].

#### 1.4.1. Le facteur héréditaire et les déséquilibres hormonaux

L'obésité est une maladie dite multifactorielle et parmi ces différents facteurs, le rôle de l'hérédité est bien connu. Plusieurs gènes responsables ont été identifiés et ces derniers interviennent essentiellement sur la production de leptine par les adipocytes ainsi que sur son action. Cette protéine agit au niveau du SNC sur le contrôle de l'appétit et de la dépense énergétique.

Parmi les quelque 250 millions de cas d'obésité dans le monde, seulement 78 seraient le résultat de mutations au niveau d'un seul gène. Ces cas se caractérisent le plus souvent par une forme sévère et précoce d'obésité. Ces formes sont le résultat de 34 mutations au sein de sept gènes différents, soit les gènes de la prohormone convertase-1 (PCSK1), de la leptine (LEP) et de son récepteur (LEPR), de la pro-opiomélanocortine (POMC), des récepteurs aux mélanocortines de type 3 (MC3R) et 4 (MC4R) et du gène SIM1 (single-minded homolog 1) [1].

- **Les parents**

L'obésité parentale constitue un facteur de risque très important d'obésité juvénile puisque ce risque est multiplié par 3 si un des deux parents est obèse et par 5 si les 2 parents le sont. Cependant, l'obésité à l'adolescence dépend plus du statut pondéral pendant l'enfance que du statut pondéral des parents (tableau 3) [28].

## Synthèse bibliographique

Tableau 3 : Risque relatif d'obésité à l'âge adulte (D'après Picoche-Gothié 2005). [28].

Age	Si obésité à cet âge (contre poids normal)	Si 1 parent obèse (contre aucun)	Si 2 parents obèses
1 à 2 ans	1.3	3.2	13.6
3 à 5 ans	4.7	3	15.3
6 à 9 ans	8.8	2.6	5
10 à 14 ans	22.3	2.2	2
15 à 17 ans	17.5	2.2	5.6

### 1.4.2 Les facteurs environnementaux

Certains déterminants liés à l'environnement peuvent avoir un effet sur les individus et les choix qu'ils font. Par exemple, les milieux dans lesquels ils vivent, ruraux ou urbains, et leur aménagement, sont des facteurs qui peuvent favoriser l'habitude de faire de l'activité physique, fréquemment ou non. Les principaux facteurs selon l'OMS sont les changements d'alimentation observés à l'échelle mondiale ainsi que la tendance à faire moins d'exercice physique [20].

- **Déséquilibre entre apport et dépense énergétique**

Les études épidémiologiques montrent que l'augmentation de la prévalence de l'obésité, n'est pas liée seulement à une augmentation de l'apport énergétique total ou de l'apport en matière grasse, que ce soit chez les adultes, chez les enfants ou les adolescents. L'obésité serait plutôt causée par des mauvaises habitudes ou comportements alimentaires. En effet, La déstructuration des repas ainsi que le fait de manger à l'extérieur du foyer dans des restaurants de type « fastfoods » favorisent la prise de poids. Les repas pris en dehors du foyer se caractérisent par une alimentation grasse, des boissons sucrées et des portions importantes, constituant un facteur prépondérant dans l'élévation de la prise de poids [9].

### 1.4.3. Les facteurs psychologiques

Parfois les troubles psychologiques induisent une modification du comportement alimentaire favorisant la prise de poids. L'ingestion des aliments apparaît comme une réponse comportementale à un désordre affectif, une anxiété, une émotion [16].

### 1.5. Physiopathologie de l'obésité

La physiopathologie de l'obésité relève de causes multifactorielles dont les mécanismes soulignent l'importance cruciale du contrôle pondéral pour le maintien de la santé. L'obésité résulte naturellement d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports et les dépenses énergétiques. Même si le terrain génétique est susceptible de favoriser le développement de l'obésité (en intervenant sur les systèmes de contrôle de la balance énergétique), il est clairement démontré que les modifications rapides des habitudes alimentaires et la promotion des activités sédentaires au siècle dernier ont toutes deux contribué largement à cet accroissement de prévalence. L'apport alimentaire est modifié dans son rythme et dans son contenu (plus de glucides simples et de lipides saturés, moins de fibres) [26].

Globalement, on distingue l'étape constitutive de l'obésité où peu de complications sont observées et « l'obésité maladie » qui s'accompagne de complications multiples. Sur le plan métabolique, l'obésité est le plus souvent associée à l'insulinorésistance, étape qui précède l'apparition du diabète de type 2. Cette insulinorésistance est liée à l'infiltration des tissus, notamment musculaires, par les lipides en raison d'un flux permanent et accru d'acides gras libres plasmatiques dans ces tissus. Ces perturbations métaboliques s'accompagnent généralement d'un dysfonctionnement mitochondrial du muscle squelettique, dysfonctionnement qui a été récemment proposé comme le principal facteur causal responsable des pathologies métaboliques associées à l'obésité[26].

En outre, le tissu adipeux possède aussi des caractéristiques métaboliques uniques lui conférant un véritable statut de glande endocrine. Le tissu adipeux est capable de sécréter des substances médiatrices de l'inflammation, de l'athérosclérose, de l'hypertension et bien d'autres potentiellement impliquées dans le développement du syndrome métabolique et des complications associées au développement du tissu adipeux. Parmi ces « hormones » adipeuses, encore appelées « adipokines », on trouve l'adiponectine dont le rôle est de stimuler l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique, pouvant donc contrecarrer la diminution des capacités du muscle à oxyder les lipides. La leptine, également sécrétée par le tissu adipeux, et dont le rôle est de signaler au système nerveux central l'état des réserves adipeuses corporelles. La qualité du dialogue entre le tissu adipeux et le muscle peut donc participer à l'induction ou à la correction du dysfonctionnement mitochondrial et contribuer au déséquilibre métabolique [26].

D'autres pistes récentes permettent d'expliquer le développement rapide de l'obésité dans nos pays. Il s'agit de la théorie microbienne, notamment de la microflore intestinale et de « l'empreinte » fœtale. En effet, le changement de flore microbienne intestinale est capable à la fois de modifier nos capacités digestives et d'activer l'inflammation postprandiale physiologique. Ainsi, tout changement alimentaire provoque aussi un changement de flore susceptible de favoriser le développement de l'obésité. En ce qui concerne la nutrition fœtale, il semble que la vitesse de croissance, notamment durant les premières années de vie, et la précocité du « rebond d'adiposité » (phase de croissance rapide de la masse grasse après 6 ans) sont déterminantes pour le devenir métabolique du futur adulte. Enfin, d'autres explications ont été avancées telles que la dette de sommeil, l'utilisation de psychotropes ou la présence de perturbateurs endocriniens [26].

## **2. La salive**

### **2.1. Définition**

La salive est un liquide biologique indispensable à l'intégrité de la cavité buccale et de ses composants. C'est un liquide aqueux, incolore, translucide et dont la viscosité dépend de sa sécrétion [5]. La salive est la première sécrétion digestive. Elle est sécrétée par les glandes salivaires sous maxillaires, sublinguales et parotidiennes. Elle joue un rôle essentiel de par ses propriétés lubrifiantes [21]. Ainsi qu'un rôle primordial dans la digestion des aliments et permet d'en apprécier le goût [2].

### **2.2 Composition de la salive**

#### **2.2.1. L'eau**

L'eau est le constituant pondéral principal (990 mL/L) [3].

#### **2.2.2. Constituants inorganiques**

La salive contient des constituants ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) dont la composition varie pendant la sécrétion. Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal (tableau 4) [3].

# Synthèse bibliographique

Tableau 4 : constituants ioniques de la salive [27].

Ion	Non-stimulée (mEq/l)	Stimulée (mEq/l)	Plasma (mEq/l)
Na <sup>+</sup>	2,7	54,8	143,3
K <sup>+</sup>	46,3	18,7	4,1
Cl <sup>-</sup>	31,5	35,9	100,9
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,6	29,7	27,5

## 2.2.3. Constituants organiques

L'essentiel des composants organiques de la salive est représenté par deux catégories de protéines : les protéines extrinsèques issues du sérum, et les protéines intrinsèques, synthétisées par la glande salivaire. Plus de 1300 protéines ont été identifiées à ce jour par diverses approches protéomiques. La nature et le rôle précis de nombre d'entre elles sont encore inconnus. Il y a environ 2,5 grammes de protéines dans 1 litre de salive émise à faible débit. La concentration en protéines augmente en général avec le débit salivaire [8].

### 2.2.3.1. Protéines extrinsèques

Elles sont représentées par des albumines sériques 5 à 10% des protéines totales, des immunoglobulines de type IgA, IgG, IgM et des alphas et bêta globulines, des calprotectines ou d'autres protéines du système immunitaire. Leur concentration 20% des protéines totales décroît lorsque le débit salivaire augmente [8].

### 2.2.3.2. Protéines intrinsèques

Elles sont synthétisées par les glandes salivaires elles-mêmes et sont très nombreuses [8].

- **Les Enzymes salivaires**

- **L'amylase salivaire**

L' $\alpha$ -amylase salivaire, qui est synthétisée par les cellules séreuses et stockée dans les grains de zymogène, représente à peu près 20% de l'ensemble de la production des glandes salivaires en protéines, et constitue l'enzyme principale de la salive. Cependant, une partie des amylases salivaires provient d'autres organes (pancréas, tube digestif, foie..).

Au niveau des glandes salivaires, elle est produite par la glande parotide et de la glande submandibulaire de tous les mammifères. Il s'agit d'un métalloenzyme contenant du



## Synthèse bibliographique

---

chlore et du calcium qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$  (1, 4) de l'amidon en glucose et en maltose. Elle a un rôle dans l'initiation de la digestion et également un rôle dans la protection des dents [25].

- **La lipase linguale**

La lipase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse des lipides, et est produite en partie par les glandes sublinguales, en partie par la parotide. Le relais est ensuite assuré par le pancréas [14].

- **Les Mucines**

Les mucines sont des glycoprotéines complexes, riches en fucose ou en acide sialique. Elles ne sont pas hydrolysables par les enzymes protéolytiques et permettent de lubrifier la nourriture tout en protégeant la muqueuse buccale et digestive [14,7].

- **Le lysozyme**

C'est une protéine globulaire formée de 129 acides aminés (chez l'être humain) retrouvée dans la plupart des sécrétions de l'organisme (salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques). Dans la salive, elle représente près de 10% des protéines totales. Il hydrolyse les liaisons beta (1-4) entre acide N-acetyl muramique et N-acetyl glucosamine [7].

### **3. Lien obésité -salive -biomarqueur**

#### **3.1. Notion de biomarqueur**

Selon le National Institute of Health (USA), la définition générale d'un biomarqueur qui est actuellement répandue dans la communauté scientifique, est « une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique » [15]. un biomarqueur doit être mesuré avec fiabilité et précision. Le caractère potentiellement indirect du biomarqueur qui est porté par un ou plusieurs paramètres biologiques (caractéristiques génétiques, protéines, métabolites...) qui permet(tent) de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement [17].

### 3.2. La piste de la salive dans la génétique de l'obésité

L'amylose salivaire est un gène présent de manière répétée chez l'espèce humaine et pouvant varier de une à vingt copies en fonction des individus. Une diminution du nombre de copies de ce gène servant à digérer les sucres complexes (amidon) favorise l'obésité. C'est ce que vient de découvrir une équipe internationale coordonnée par le professeur Philippe Froguel du laboratoire Génomique et maladies métaboliques (CNRS /Université Lille 2/Institut Pasteur de Lille) . En effet, les chercheurs montrent que les personnes qui ont le plus petit nombre de copies d'amylose salivaire (et ainsi peu d'enzyme amylose dans leur sang) ont un risque multiplié par 10 de devenir obèses. Chaque copie de ce gène en moins augmente de 20% le risque d'obésité. Ces travaux, publiés le 30 mars 2014 dans *Nature Genetics*, démontrent pour la première fois le lien génétique entre la digestion des glucides complexes et l'obésité [6].

Il existe 2 formes d'amylose, l'une produite par le pancréas et l'autre par les glandes salivaires et seule la forme salivaire semble associée à l'obésité. On ne connaît pas encore pourquoi la déficience en amylose salivaire favorise l'obésité : deux hypothèses sont envisagées. D'une part la mastication des aliments et leur digestion partielle dans la bouche pourrait avoir un effet hormonal entraînant la satiété qui serait diminuée en cas de déficience en AMY1. D'autre part, la mauvaise digestion des amidons pourrait modifier la flore intestinale et ainsi contribuer indirectement à l'obésité voire au diabète comme le suggèrent les premières études du métabolome réalisées chez des personnes à haute ou basse amylose salivaire. Ainsi les personnes à basse amylose salivaire ont une glycémie anormalement élevée quand on leur fait manger de l'amidon.

Ces résultats ouvrent une piste tout à fait nouvelle de la prédisposition génétique à l'obésité passant par la digestion des glucides complexes et leur action sur la flore bactérienne de l'intestin. Ils ouvrent des perspectives importantes de prévention et de traitement plus efficaces de l'obésité prenant en compte la digestion des aliments et leur devenir intestinal [6].

# **Matériel et Méthodes**

# Matériel et méthodes

## 1. Matériels

### 1.1. Recrutement des patients

Vingt patients obèses déterminés par la mesure de l'IMC ont été étudiés. Parmi les 20 obèses, 13 femmes et 7 hommes ont été recensés. Les patients sont de tranches d'âge différentes (entre 19 et 52 ans). Les patients ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude. Cette population a été comparée à trois sujets sains de taille normale sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale. Les 23 échantillons sont représentés dans le (tableau 5).

Tableau 5 : liste des 23 échantillons analysés

Echantillons	Sexe	Age (ans)	Taille (m)	Poids (Kg)	IMC (Kg/ m <sup>2</sup> )
1	F	22	1.62	75	28.9
2	F	22	1.68	116	41.1
3	F	22	1.52	105	45.4
4	F	19	1.67	104	37.4
5	H	24	1.82	130	39.2
6	F	24	1.71	129	41.03
7	F	21	1.68	118	41.8
8	F	24	1.65	78	28.65
9	F	22	1.62	80	30.48
10	H	29	1.72	109	36.4
11	H	40	1.74	106	35.01
12	F	23	1.65	61	21.63
13	F	27	1.58	55	22.08
14	F	45	1.53	83	35.45
15	F	24	1.62	92	35.05
16	F	25	1.68	63	22.34
17	H	52	1.75	95	31.04
18	H	36	1.78	130	41.1
19	H	42	1.73	94	31.43
20	H	32	1.73	130	43.43
21	F	21	1.57	96	39.02
22	F	26	1.62	82	31.29
23	F	30	1.51	95	41.1

## 1.2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par [12]. (2005), La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice.

Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3 cm<sup>2</sup>), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 t/min pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C).

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction des protéines salivaires

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patients obèses et des sujets sains dans des conditions dénaturantes et réductrices.

50 µl de salive des patients obèses et des sujets sains sont mélangés avec 100 µl de solution d'extraction contenant 35% (v/v) de glycérol, 22% (v/v) de Tris/HCL 1M pH 6.8, 43% (v/v) d'eau distillée, 7% (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2.5% (v/v) de β-mercaptoéthanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10 000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées et réduites sont récupérés.

### 2.2. Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE

La technique d'électrophoreses utilisée est celle décrite par [18]. (1970) et modifiée par [23]. (1991), La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

Les ponts disulfures sont rompus par l'action du β mercaptoéthanol et les liaisons faible sont détruites par le SDS, ce ci abouti à la formation d'un complexe SDS- protéine dénaturée, le SDS a pour but de masquer la charge des protéines par une charge négative, il annule ainsi le fractionnement en fonction de la charge électrique, et assure donc une séparation selon la taille, la conformation et la masse moléculaire.

## Matériel et méthodes

---

- **Préparation des gels**

La technique SDS-PAGE nécessite la préparation de deux types de gels : un gel de séparation à T=12.8% et un gel de concentration à T=2.8 %. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/v), de N, N'-méthylène bis-acrylamide à 2 % (p/v), du SDS à 10% (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence de catalyseurs, le TEMED et de l'APS.

Le gel de séparation (separating gel) permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire, alors que le gel de concentration (stacking gel) permet de stocker les impuretés et de tasser les protéines avant leur entrée dans le gel de séparation.

On prépare le gel de séparation en premier puis on le coule entre deux plaques de verre verticales, en laissant un vide d'environ 4 cm pour le gel de concentration, à fin de niveler la surface du gel de séparation et de le protéger de l'air, on ajoute une fine couche de butanol. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé au dessus du gel de séparation après avoir éliminé la couche de butanol, puis des peignes à 15 puits sont délicatement insérés. Le gel de concentration prend en l'espace de 20 à 40 min, les peignes sont retirées soigneusement pour ne pas détruire les puits formés, on verse le tampon de migration dans les puits puis on procède au dépôt des échantillons à raison de 8µl.

- **La migration**

Le bac supérieur qui porte les deux plaque est rempli de tampon de migration à un niveau qui dépasse celui des gels, on le place dans la cuve d'électrophorèse ou le bac inférieur, rempli au paravent de solution de tampon de tel sorte que les faces inférieurs des gels soient immergés. La cuve d'électrophorèse est maintenue à une température constante à 4°C grâce à un système de refroidissement. Le gel de dimension 180 x 105 x 1.5 mm est soumis à une intensité constante de 40 mA, et une tension variable ne dépassant jamais le maximale de 1200 v. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire.

- **Coloration et décoloration des gels**

Les gels sont recouverts de solution de coloration contenant un fixateur de protéines le TCA à 60% et le bleu de Coomassie R250 à 1% (p/v), ils sont placés en agitation pendant 24h. Les gels sont ensuite décolorés par l'eau du robinet.

### **2.3. Lecture des électrophorégrammes**

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation et de déterminer le poids moléculaire de la bande à l'aide du marqueur de taille utilisé.

### **2.4. Analyse statistiques**

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques, les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide d'Excel 2010.

## **Résultats et discussion**



### 1. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs

#### 1.1. Analyse des profils électrophorétiques

La technique adoptée pour l'analyse est celle décrite par [18]. (1970) et modifiée par [23]. (1991) qui a été utilisée pour fractionner les protéines salivaires. Cette technique permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes consiste à révéler la mobilité de chacune des bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation.

Les diagrammes électrophorétiques des 23 échantillons (20 malades et 3 témoins) analysés renferment 31 bandes décelables qui se répartissent dans deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 1 à 135 mm.

Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 31 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 15 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaire de HPM et 16 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines de FPM.

La comparaison des profils électrophorétiques des obèses et des sujets sains révèle des variations quantitatives et qualitatives.

A titre d'exemple la bande protéique b20 est fortement concentrée chez les patients (7,10,11), elle est moins concentrée chez le témoin (13) et les patients (6,8,14,15,17, 18 ,19,21,23) et en état de trace chez les témoins (12,13) et certains patients (1,5,9,16,20), mais à cause de son absence chez les patients obèses (2,4,22), cette protéine ne peut pas être considérée comme biomarqueur salivaire de l'obésité (figure 2 et 3).

La bande protéique b10 est fortement concentré chez les patients (2.4.5.6.7..), elle est moins concentrée chez les patients (14.15) et encore faiblement concentrée chez certains patients (1.10). Elle est absente chez les témoins (12.13). Donc cette protéine varie qualitativement (présente chez les obèses et absente chez les témoins) ce qui peut lui conférer la propriété de biomarqueur qualitative de l'obésité (figure 2 et 3).

De même, La bande protéique b11 varie qualitativement où elle est absente chez les témoins et présente avec des concentrations différentes chez les personnes obèses. Elle est fortement concentrée chez les patients (2.3.4.5.6...), moins concentrée chez les patients (10.15.23) et faiblement concentrée chez le patient (1) (figure 2 et 3). Elle peut être considérée donc comme biomarqueur qualitative de l'obésité.

## Résultats et discussion

Pour les variations quantitatives, la bande protéique b28 est omniprésente (témoins et malades) avec des concentrations faibles chez les témoins (figure 2 et 3). Cette bande protéique peut être considérée comme un biomarqueur quantitatif de l'obésité.

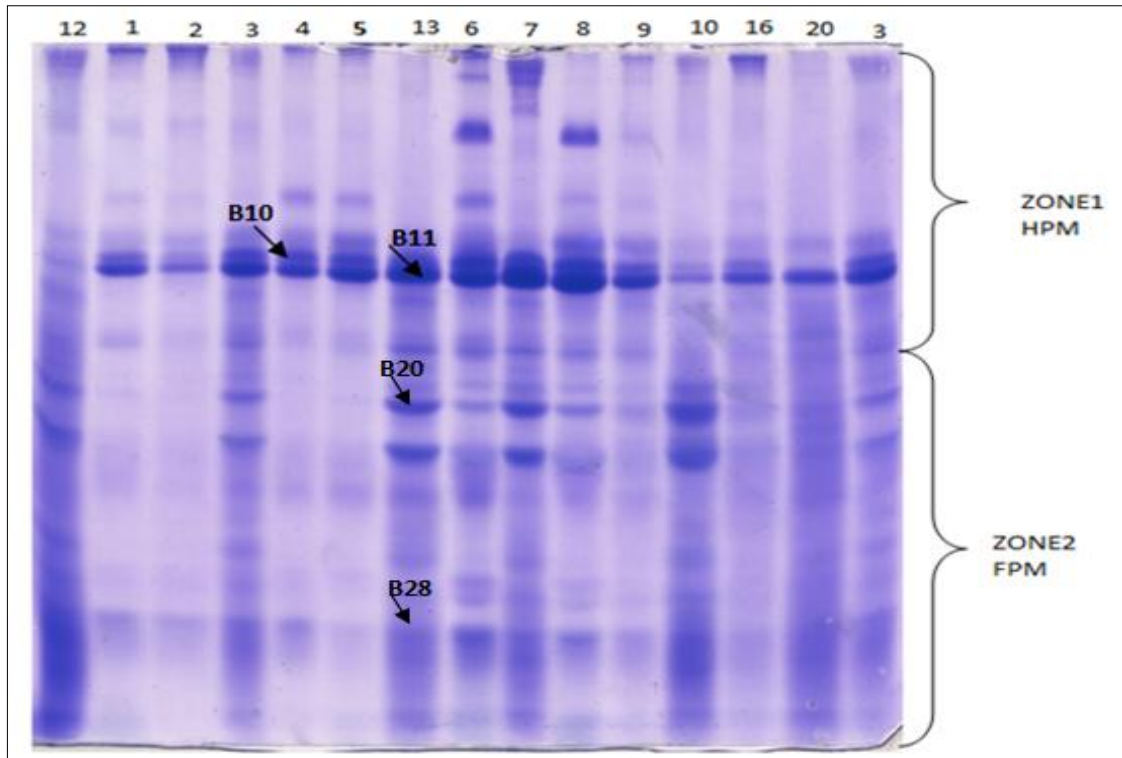


Figure 2 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. 12 13 16 : témoins. 1 à 10 patients

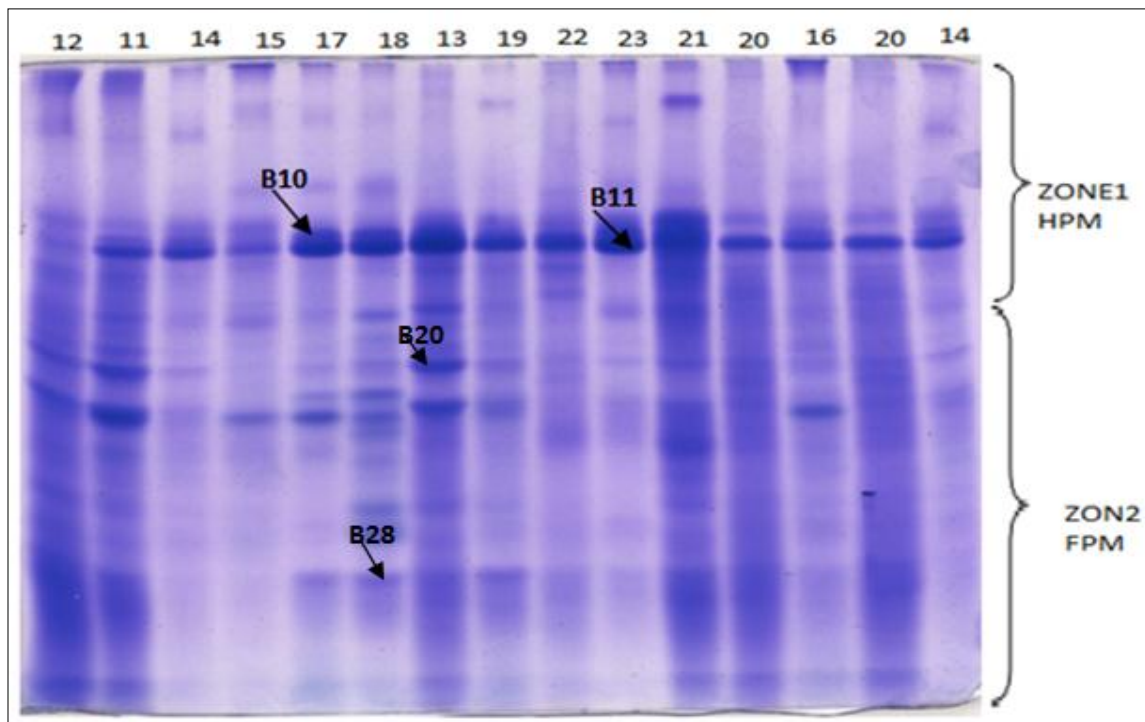


Figure 3: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. 12 13 16 : témoins. 11 à 21 patients

## Résultats et discussion

### 2. Etude de la variabilité des protéines salivaires

#### 2.1. Etude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 23 échantillons a permis de distinguer 15 types de protéines salivaires de haut poids moléculaires (tableau 6).

Tableau 6: variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
1	1	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E12 E15 E16 E17 E18 E20 E21 E22 E23	65
2	2	E2 E7 E8 E9 E10 E12 E16 E20	35
3	6	E6 E7 E11 E21	17
4	9	E15 E19 E21	13
5	13	E7 E23	9
6	15	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E8 E9 E11 E12 E14	48
7	30	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E8 E9 E15 E16 E17 E18 E22 E23	61
8	38	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E12 E13 E16 E20	61
9	42	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E22 E23	91
10	44	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E21 E22 E23	87
11	46	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E21 E22 E23	87
12	51	E3 E6 E7 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E16 E18 E19 E20 E22	65
13	53	E11 E14 E15 E17 E18 E21 E23	30
14	57	E16 E20	9
15	59	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E12 E13 E19	56.5

## Résultats et discussion

D'après le tableau, La plus haute fréquence protéique observée est celle de la bande protéique 9 dont la mobilité est de 42 mm retrouvée chez 21 échantillons avec une fréquence maximale de 91%, ce qui implique sa dominance dans la zone 1. Suive de la bande protéique 10 de mobilité 44 mm et la bande protéique 11 dont la mobilité est de 46 mm présentent toutes les deux chez 20 échantillons avec une fréquence de 87%. Les deux bandes protéiques 1 et 12 dont les mobilités sont respectivement 1mm et 51 mm ont la même fréquence de 65%. Puis les bandes protéiques 7 et 8 qui apparaissent avec des mobilités de 30 et 38 mm respectivement ont la même fréquence de 61%. Enfin la plus faible fréquence se situe au niveau des bandes protéiques 5 et 14, avec une fréquence de 9%.

### 2.2 Etude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire des 23 échantillons nous a permis de distinguer 16 protéines salivaires de mobilités différentes (tableau 7).

**Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de FPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
16	60	E11 E14 E15 E17 E19	22
17	61	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E13	35
18	65	E5 E6 E7 E13	17
19	68	E3 E6 E7 E8 E9 E10 E12 E13 E16 E20	43
20	72	E1 E3 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E21 E23	87
21	77	E20	4
22	81	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E12 E13 E16 E17 E20 E21	74
23	90	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 15 E16 E17 E18 E20	83
24	94	E3 E7 E10 E12 13 16 E18 E20	35
25	103	E3 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E15 E16 E18 E19 E20 E21 E22	74
26	108	E6 E8 E9 E11 E14 E15 E17 E18 E19 E20 E21 E22 E23	56.5

## Résultats et discussion

27	111	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E12 E13 E16 E20	61
28	118	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E21 E22 E23	100
29	122	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E12 13 16 E20	61
30	130	E10 E12 E13 E20	17
31	135	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 E21 E22	91

D'après le Tableau 7, la bande protéique 28 dont la mobilité est de 118 mm présente chez les 23 échantillons a une fréquence de 100%, donc cette bande est la protéine salivaire dominante dans cette zone (FPM). Suivie de la bande 31 dont la mobilité est de 135mm qui se trouve chez 21 échantillons avec une fréquence de 91%. Les 2 bandes 22 et 25 ayant des mobilités de 81 et 103mm respectivement ont la même fréquence de 74%.

Les 2 bandes protéiques 27 et 29 ayant des mobilités classées respectivement 111mm et 122 mm sont fréquentes avec 61%.

Les bandes protéiques 17 et 24, qui apparaissent avec des mobilités de 61 et 94mm sont moins fréquentes avec 35%. Enfin on retrouve la bande protéique 21 dont la mobilité est de 77mm présente uniquement chez un seul échantillon avec une fréquence de 4%.

### 3. Etablissement des diagrammes types

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitatives et quantitatives pour les différents patients.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des individus considérés deux à deux.

Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'identification.

Nous rapportons dans les tableaux ci-dessous les diagrammes types des protéines salivaires des patients obèses et des sujets sains de taille normale. (1 : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande, M : Mobilités, B : bandes protéiques).

## Résultats et discussion

**Tableau 8: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices**

B	M (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
2	2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
5	13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	15	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	30	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
8	38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
9	42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
10	44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	51	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
13	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
14	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
15	59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
17	61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
18	65	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	68	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
20	72	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
21	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
23	90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
24	94	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
25	103	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
26	108	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
27	111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
28	118	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	122	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
30	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
31	135	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

## Résultats et discussion

### 4 .Indice de similarité des diagrammes protéiques

Pour quantifier l’analogie ou la dissemblance des diagrammes, on calcule un indice de similarité ou de dissimilarité inspiré de Dedio, et al., (1969). L’indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé en rapportant l’indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l’un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L’IAS présente l’ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes d’une autre c'est-à-dire qu’ils ont la même mobilité.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins. La plupart des échantillons reste différenciable car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

Les indices de similarités ont été effectués pour les 23 échantillons (20 personnes obèses et 3 témoins), ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 9. Il en ressort que l’indice de similarité se situe entre 12 et 100%.

Tableau 9: matrice des indices de similarité entre les échantillons

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
100%	82%	75%	88%	88%	68%	52%	67%	70%	57%	24%	50%	45%	33%	38%	59%	47%	38%	33%	50%	26%	32%	39%
	100%	74%	81%	83%	65%	54%	71%	71%	59%	22%	55%	43%	27%	41%	64%	95%	38%	36%	50%	29%	37%	29%
		100%	75%	80%	86%	71%	82%	82%	81%	33%	73%	73%	43%	38%	82%	73%	52%	43%	68%	33%	43%	29%
			100%	94%	71%	50%	67%	67%	55%	28%	50%	45%	37%	38%	55%	47%	40%	33%	48%	29%	39%	33%
				100%	77%	58%	68%	68%	57%	26%	44%	55%	36%	41%	61%	50%	41%	36%	50%	32%	42%	35%
					100%	72%	83%	83%	63%	40%	54%	67%	48%	44%	68%	46%	50%	53%	63%	42%	50%	35%
						100%	74%	71%	82%	32%	63%	76%	36%	31%	71%	28%	42%	42%	65%	36%	29%	24%
							100%	100%	31%	39%	65%	61%	50%	42%	74%	43%	50%	55%	50%	33%	43%	30%
								100%	77%	39%	65%	61%	50%	42%	77%	43%	48%	50%	68%	33%	43%	30%
									100%	29%	76%	84%	35%	32%	74%	33%	43%	45%	87%	29%	32%	20%
										100%	26%	32%	77%	53%	32%	35%	47%	47%	32%	47%	26%	31%
											100%	78%	29%	27%	65%	24%	33%	30%	70%	25%	22%	12%
												100%	30%	19%	57%	26%	35%	36%	63%	21%	23%	13%
													100%	69%	43%	63%	69%	63%	40%	44%	60%	47%
														100%	42%	80%	52%	59%	38%	63%	60%	50%
															100%	43%	43%	79%	83%	33%	43%	70%
																100%	69%	53%	46%	42%	53%	69%
																	100%	50%	52%	53%	71%	60%
																		100%	40%	56%	53%	35%
																			100%	36%	41%	30%
																				100%	60%	50%
																					100%	55%
																						100%

## Résultats et discussion

---

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances c'est le cas du patient 23 avec le patient 12 (IRS= 12%) et le même patient 23 avec le patient 13 (IRS=13%), ainsi que le patient 15 avec le patient 13 (IRS=19%).

Lorsque la valeur de l'IRS=100%, cela signifie que les profils sont similaires (ces deux patients présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique), c'est le cas des patients 9 et 8.

Des valeurs d'IRS moyennes ont été aussi observées, à titre d'exemple : (IRS=50%) qui a été trouvé : entre le patient 12 (T1) et le patient 4, le patient 14 avec les patients 8 et 9, le patient 20 avec le patient 1 et 2, le patient 19 avec le patient 18.

Ainsi, on distingue des valeurs d'IRS importantes, par exemple :

- IRS de 60% entre les patients : 22 et (14,15), 23 et 18, 22 et 21.
- IRS de 75% entre les patients : 3 et 1, 4 et 3.
- IRS de 95% entre les patients : 17 et 2.

Il existe une relation entre l'hétérogénéité électrophorétique des protéines salivaires et l'état physiologique des patients obèses. Les patients dont les diagrammes sont très proches ont en effet généralement une composition protéique voisine et présentent naturellement à la fois des ressemblances protéiques d'où physiologique proches et des indices de similarités élevés. A l'inverse, les obèses dont les diagrammes sont très différents, ont le plus souvent des origines physiologiques éloignées et des IRS faibles.



# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion

---

Ce travail a été entrepris afin d'explorer le protéome salivaire des patients obèses et le comparer avec celui des sujets sains par application de la techniques d'électrophorèse monodimensionnelles 'SDS-PAGE', pour la recherche de protéines spécifiques pouvant avoir la propriété de biomarqueur pour le diagnostic spécifique de la maladie.

L'application de la technique d'électrophorèse nous a permis d'obtenir des profils protéiques salivaires nettement séparés et reproductibles où 31 bandes protéiques de mobilités et d'intensités différentes, réparties dans les deux zones de FPM et HPM, ont été détectées dans les conditions dénaturantes et réductrices. Ainsi cette technique nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaires.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des patients malades (obèses) et des témoins
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires de la maladie.

L'application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais elle reste insuffisante. Pour cela, nous envisageons l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle pour une meilleure séparation des protéines d'intérêt. Ceci sera poursuivi par la caractérisation de ces protéines par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des biomarqueurs de l'obésité.

# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- [1] Albertus C., “Relations entre obésité et maladie parodontale” Academie de nancy-metz, université de lorraine faculté d’odontologie ( Mai 2015),pp. 45-52.
- [2] Benoit F., “Effet des polysaccharides présente dans le vin sur les interactions tanins-protéins”., Bordeaux (novembre 2014) ,p.4.
- [3] Christelle J., “Etude expérimentale du test salivaire cario analyse sur des patients subissant une radiothérapie de la shere orofaciale”.,Nancy (Juin 2006),pp. 32-33.
- [4] Elise G-P., “Pratique d’une activité physique et ses facteurs limitants dans une population d’adultes obèses,Diminution des affects dépressifs et possibilités d’action par le médecin généraliste”., Nancy (Novembre 2013).
- [5] Eve T-R., “Ameloration de l’hygiene buccodentaire par le conseil en officine”.,Toulouse (december 2015) ,p.38.
- [6] Froguel P., Laetitia L., “la piste de la salive dans la génétique de l’obésité”,institut pasteur de lille,université lille 2 droit et santé,communiqué de presse national”.,paris ;Vol.3(mars 2014),pp.1-2.
- [7] Ganong W., “physiologie médicale des glandes salivaires et la salive” (2005),p.849.
- [8] Georges D., “Pathologies générales et salive”., Nancy (février2012),p. 42.
- [9] Hadjer D., “L’obésité de l’adolescent Constantinois: étude épidémiologique,prédisposition génétique, hormonale, et conséquences métaboliques”., Constantine (2016),p.4.
- [10] Haute Autorité de Santé., “Surpoids et obésité de l’adulte”., Disponible sur : [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)(2011).
- [11] Haute Autorité de Santé ., “Surpoids et obésité de l’enfant et de l’adolescent ” .,Disponible sur :<http://www.has-sante.fr> (Septembre 2011).
- [12] Hirtz C., Chevalier F., Raingard I., Egea J-C., Bringer J., Rossignol M., Deville De périère D., “preliminary research for humain salivary markers in type 1 diabetes” ,les cahier de l’ADF., N° 18-19(2005), pp. 4-9
- [13] Jérôme C., “Comprendre et traiter l’obésité approche pluridisciplinaire intégrative” ,Elsevier Masson sas.,Vol.202(2017),pp.10-12.
- [14] Jerom C., “ étude expérimentale du test salivaire cario analyse sur des patients subissant une radiothérapie de la sphère oro faciale”.,thèse de docteur en chirurgie dentaire.metz :université henri poincar-nancy1 (2007),p.117.
- [15] Julien R., “interet des marqueurs biologique dans Les essais clinique”.,Nancy (Juillet 2011),p.21.

## Références bibliographiques

---

[16] Schlienger J-L., “obésité de l’adulte ,diagnostic, enjeux et prise en charge service de médecine interne”., endocrinologie, nutrition hôpital de haute-pierre

[17] L’afssaps , “Les biomarqueurs des produits de santé et l’afssaps”

[18] Laemmli U-K., “ Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”., Nature ; Vol. 227 (1970), pp. 680-685.

[19] Micaela L-Ö., “influence de l’alimentation dans l’émergence de la lithaïse salivaire”, geneve (2005), pp.13-14.

[20] Monica T., M Sc., “ obésité préoccupation mondiale de santé publique, analyse des impacts de la mondialisation sur la santé” (janvier 2011).

[21] Phys\_digest, la salive , p.1.

[22] Ritz P., Dargent J., “Abord clinique du patient obèse, comment définir l’obésité à l’examen clinique”., Springer-verlag France ; Vol.143(2009) , pp.13-14.

[23] Singh N-K., Shepherd K-W., Cornish G-B., “A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin”., J.Cereal.Sci., Vol.14 (1991), pp.203-208.

[24] Valero R., “ Obésité de l’enfant et de l’adulte” (2014).

[25] Wided K-L., “Effets de deux xéno-hormones, la génistéine et la vinclozoline, sur le développement et les fonctions exocrines et endocrines des glandes salivaires submandibulaires de rats Wistar Han , Influence de la période d’exposition en fonction de l’âge et du sexe”., université de bourgogne école doctorale environnement, santé/stic (décembre 2012).

[26] Boirie Y., “Obésité, physiopathologie et conséquences” (2009).

[27] Young J-A., Schneyer C-A., “Composition of saliva in mammalia”, Australian journal of Experimental Biology and Medical Science ; Vol.59(1981), pp. 1-53

[28] Youssef H., “L’obésité de l’adolescent Libanais” , étude épidémiologique et effets d’un exercice aigu et chronique sur le stress oxydant d’adolescentes en surpoids” (2008).

**Annexe**

# Annexe

---

## Solutions utilisées pour la SDS-PAGE

- **Solution mère d'acrylamide à 40%** (à préparer avec gants et masque)

• Acrylamide	40 g
• Eau distillée	100ml

## Solution mère de bisacrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

• Bisacrylamide	2g
• Eau distillée	100ml

## Solution d'ammonium persulfate à 1% (à préparer temporairement)

• APS	0.1g
• Eau distillée	10ml

## Sodium stock de SDS à 10%

• Sodium Dodécyl Sulfate	10g
• Eau distillée	100ml

## Tampon Tris HCl PH 6.8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

• Tris	30.285 g
• Eau distillée	qsq 200 ml
• Ajuster à pH 6.8 avec du HCl fumant	19.5 ml
• Eau distillée	qsq 250ml
• qsq 250 ml	

## Tampon Tris HCl Ph 8.8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

• Tris	60.57 g
• Eau distillée	qsq400ml
• Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant	8 à10 ml
• Eau distillée	qsq 500 ml

## • Tampon de migration

• Glycine	70.55g
• Tris	15g
• SDS	2g
• Eau distillée	qsq 5000 ml

## Solution de coloration (pour deux gels)

## Annexe

---

- TCA 60% 100 ml
- Solution mère de bleu de coomassie R250 25g
- Eau distillée qsq 5000ml

### **Solution mère de bleu de coomassie R250**

- Bleu de coomassie R250 10 g
- Ethanol 95 qsq 1000 ml

### **Solution de séparation (runing gel)**

- Acrylamide 40% 12.4 ml
- Bisacrylamide 2% 2.4 ml
- Eau distillée 8.6 ml
- Tampon Tris HCl PH 8.8 15.2 ml
- SDS 10% 1ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 20 $\mu$ l

### **Gel de concentration (stacking gel)**

- Acrylamide 40% 1 ml
- Bisacrylamide 2% 0.3ml
- Eau distillée 10.2 ml
- Tampon Tris HCl PH 6.8 1.7 ml
- SDS 10% 0.14 ml
- APS 1% 0.70ml
- TEMED 0.014 $\mu$ l



Année universitaire : 2016/2017

Présenté par : Maazouzi ahlem  
Boukedjouta malika

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie**  
**Option : Nutrition Moléculaire et Santé**

**Thème : Exploration du protéome salivaire des sujets obèses par application de la technique d'électrophorèse**

**Résumé**

L'obésité est devenu un problème majeur de santé publique avec une prévalence qui dépasse les 30 % dans certaines sociétés occidentales. L'obésité est un reflet du développement excessif du tissu adipeux lié à un stockage massif de lipides sous forme de triglycérides (hypertrophie et hyperplasie adipocytaires) et due à un déséquilibre de la balance énergétique. Les déterminants de l'obésité sont multiples et leur interaction complexe. Au-delà de facteurs biologiques ou génétiques individuels que l'on ne peut négliger, il s'agit d'une maladie à part entière qui altère la qualité de vie et entraîne des complications somatiques, psychologiques et sociales. L'utilisation des biomarqueurs protéiques apparaît prometteuse comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique.

L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints d'obésité par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle pour la recherche des biomarqueurs salivaires de cette pathologie. Pour cela 20 patients ayant l'obésité ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus des protéines salivaires du sujet sain et les malades. Les protéines salivaires sont extraites dans la condition dénaturante réductrice. L'analyse des gels a permis de dénombrier 31 bandes protéiques de mobilités différentes.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines salivaires spécifiques et/ou variantes au cours d'obésité susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de ce pathologie étudié, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

**Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie  
Université des frères Mentouri Constantine**

**Mots clés** : L'obésité, salive, biomarqueurs, électrophorèse, diagnostique.

**Jury d'évaluation :**

<b>Président du jury :</b>	Mr. KHLIFI.D	(Prof- UFM Constantine),
<b>Examineur :</b>	Mr. NOUADRI Tahar	(Prof- UFM Constantine).
<b>Encadreur :</b>	Mme. BELLILI	(Dr - UFM Constantine),